

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:
2004年3月18日(18.03.2004)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 2004/022598 A1

(51) 国际分类号⁷: C07K 19/00, C12N 15/62, 15/12, A61K 38/16, A61P 7/02

(21) 国际申请号: PCT/CN2003/000743

(22) 国际申请日: 2003年9月3日(03.09.2003)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
02129086.5 2002年9月3日(03.09.2002) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 中国人民解放军军事医学科学院放射医学研究所(INSTITUTE OF RADIATION MEDICINE, ACADEMY OF MILITARY MEDICAL SCIENCES, PLA) [CN/CN]; 中国北京市太平路27号, Beijing 100850 (CN)。北京鲁银利华医药科技发展有限公司(BEIJING LU YIN LI HUA PHARMACEUTICAL SCIENCE TECHNOLOGY DEVELOPMENT COMPANY, LTD.) [CN/CN]; 中国北京市大兴工业开发区科苑路18号, Beijing 102600 (CN)。

(72) 发明人:及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 石炳兴(SHI, Bingxing) [CN/CN]; 吴祖泽(WU, Zuze) [CN/CN]; 于爱平(YU, Aiping) [CN/CN]; 董春娜(DONG, Chunna) [CN/CN]; 中国北京市太平路27号, Beijing 100850 (CN)。

(74) 代理人: 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 (CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE); 中国北京市阜成门外大街2号万通新世界广场8层, Beijing 100037 (CN)。

(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

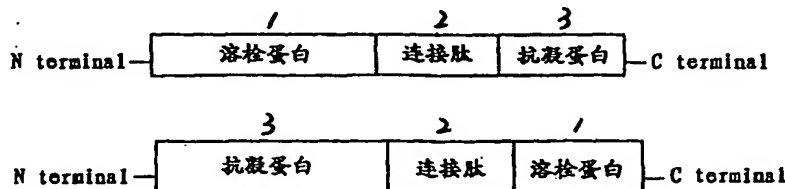
(84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

本国际公布:
— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: FUSED PROTEIN WITH THE FUNCTION OF BOTH HEMOLYSIS AND ANTICOAGULATION AND THE USE OF IT

(54) 发明名称: 溶栓和抗凝双功能融合蛋白及应用



1....HEMOLYSIS PROTEIN
2....CONJUNCTIVE PEPTIDE
3....ANTICOAGULATION PROTEIN

(57) Abstract: The invention involved a fused protein with the function of both hemolysis and anticoagulation and its conjunctive peptide, particularly, the invention involved anticoagulation protein and the protein molecular with the function of profibrinolysin activation which were linked by the conjunctive peptide with the amino acid sequences identified and cracked by coagulation factors. The medical use of this fused protein and the use of conjunctive peptide with the amino acid sequences identified by coagulation factors useful for linking hemolysis protein and anticoagulation protein.

BEST AVAILABLE COPY

[见续页]

WO 2004/022598 A1



(57) 摘要

本发明涉及溶栓和抗凝蛋白的融合蛋白及其连接肽，更具体地说，本发明涉及抗凝蛋白与具有纤溶酶原激活作用的蛋白质分子通过能被凝血因子识别并裂解的氨基酸序列作为连接肽连接而成的融合蛋白，该融合蛋白的医药学用途，能被凝血因子识别序列的连接肽用于连接溶栓和抗凝两种蛋白的用途。

溶栓和抗凝双功能融合蛋白及应用

技术领域

本发明涉及溶栓和抗凝蛋白的融合蛋白及其连接肽，更具体地说，本发明涉及抗凝蛋白与具有纤溶酶原激活作用的蛋白质分子通过能被凝血因子识别并裂解的氨基酸序列作为连接肽连接而成的融合蛋白，该融合蛋白的医药学用途，能被凝血因子识别序列的连接肽用于连接溶栓和抗凝两种蛋白的用途。

背景技术

心血管疾病是人类近年面临的头号杀手。目前临床应用于血栓治疗的主要溶栓药物有尿激酶和组织型纤溶酶原激活剂，主要抗凝药物有肝素和水蛭素。虽然溶栓治疗对降低血栓病人的死亡率起到了重要作用，但溶栓治疗过程中产生的细小凝血块进入血液循环容易引发再次栓塞。因此，临床上通常采用肝素或水蛭素作为抗凝药物与溶栓药物进行组合治疗。

然而，溶栓药物和抗凝药物在临床上常常因选择性不强而在全身发生溶血和抗凝作用，因而引起系统出血。

更具体地讲，组织型纤溶酶原激活剂（t-PA）、链激酶（SK）、尿激酶（UK）、尿激酶样纤溶酶原激活剂（u-PA）具有活化纤溶酶原的作用，活化的纤溶酶在溶解血栓部位纤维蛋白的同时也不同程度地引起了系统非血栓部位出血等不同副作用。葡激酶（SAK, Staphylokinase）是新一代天然的纤溶酶原激活剂，对血栓具有一定的选择性。

水蛭素（Hirudin, HV）是新一代天然抗凝小分子蛋白药物，对凝血酶具有高的亲和性和选择性抑制作用。然而，水蛭素在临床上容易引起系统出血，并且水蛭素没有相应的对抗剂。

因此，在提高溶栓治疗效果的同时，如何提高溶解血栓药物的选

择性，从而降低药物的副作用至关重要。提高药物的靶向性从而提高血栓部位药物的局部浓度、降低非血栓部位的药物浓度或药物活性对提高治疗效果和减少系统出血等副作用具有重要意义。国内外报道的融合蛋白均不能降低系统出血等任何副作用。

为此，进一步尝试开发具有溶栓和抗凝双功能药物是目前抗血栓药物开发的焦点之一。为获得溶栓和抗凝的双功能，国内外对水蛭素与 SAK、SK 的融合方法进行了研究，结果表明，如果水蛭素的 N 末端与 SAK 或 SK 的 C 末端融合，则水蛭素的抗凝血酶的活性均告丧失，仅保留了溶栓蛋白的活化纤溶酶原活性或部分该活性；如果水蛭素的 C 末端与 SAK 的 N 末端相连，因 SAK 的 N 末端在体内迅速降解，融合蛋白尚未起到双功能作用就发生了降解。因此，开发能同时具有溶栓和抗凝活性的融合蛋白对于血栓治疗具有重要意义。

发明目的

本发明的目的在于开发并提供一种能同时具有溶栓和抗凝功能的融合蛋白。

发明内容

本发明现已发现，通过用含有能被凝血因子识别序列的连接肽可有效的将溶栓蛋白和抗凝血蛋白连接起来而成的融合蛋白，该融合蛋白具有如下的特征：融合蛋白保持溶栓蛋白的活化纤溶酶原活性而保留溶栓功能；抗凝血蛋白如水蛭素的 N 末端与溶栓蛋白的 C 末端相连时，完整的融合蛋白在体外和血液系统非血栓部位没有抗凝活性，从而避免或减小了因抗凝血蛋白如水蛭素引起的系统出血的副作用；利用抗凝血蛋白如水蛭素的 C 末端与凝血酶的强亲和力赋予融合蛋白靶向性，从而提高药物蛋白在血栓部位的局部浓度、降低临床用药量；融合蛋白随血液循环到达血栓部位后，血栓部位

特有的、参与血栓形成的凝血因子可迅速在设计的识别位点降解融合蛋白，释放出游离的溶栓蛋白和抗凝蛋白，获得完整的抗凝和溶栓两种活性。本发明基于上述特征的发现现已完成。

因此，本发明第一方面涉及含有溶解血栓蛋白，抗凝血蛋白及连接肽的融合蛋白。

本发明再一方面涉及制备含溶解血栓蛋白和抗凝血蛋白的融合蛋白的方法，其包括将溶解血栓蛋白基因与抗凝蛋白基因用含 IEGR 或 GPR 序列对应碱基连接成融合蛋白基因，然后融合蛋白基因在大肠杆菌，酵母或动物细胞体系中表达而得到融合蛋白。

本发明再一方面涉及含有融合蛋白及药用载体或赋形剂的药物组合物。

本发明再一方面涉及含有凝血因子识别序列的连接肽在制备含有溶解血栓和抗凝血蛋白的融合蛋白中的用途。

本发明再一方面涉及能被凝血因子识别并裂解序列的连接肽作为溶解血栓和抗凝血蛋白的连接剂。

本发明再一方面涉及治疗与血栓形成有关的疾病与症状的方法，其包括给予血栓患者治疗有效量的融合蛋白。

附图说明

结合附图举例进一步说明本发明，不构成对本发明的限制。

图 1 融合蛋白的连接示意图。

图 2 融合蛋白基因、葡激酶(SAK)基因、水蛭素(HV2)基因的电泳图。

根据本发明，术语“溶栓蛋白”是指可促使血栓溶解的蛋白，如葡激酶(SAK)，组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)、链激酶(SK)、尿激酶(UK)、尿激酶样纤溶酶原激活剂(u-PA)、蛇毒等具有活化其它溶血因子或直接具有溶栓作用的蛋白，或它们的突变体。优选葡激酶(SAK)或其突变体。

根据本发明，术语“抗凝蛋白”或“抗凝血蛋白”是指能够抗凝血的蛋白，如水蛭素、抗凝血酶 III、蛇毒等，或它们的突变体。优选水蛭素或其突变体。

根据本发明，术语“凝血因子识别序列的连接肽”是指氨基酸四肽序列 IEGR (IleGluGlyArg) 或含有 IEGR 的肽段，或氨基酸三肽序列 GPR (GlyProArg) 或含有 GPR 的肽段。

根据本发明，术语“与血栓形成有关的疾病与症状”是指由血栓引起的任何疾病或症状，如脑血栓、动脉血栓、中风、动脉粥样硬化等。

根据本发明，术语“患者”是指哺乳动物，尤其是人。

根据本发明，本发明的融合蛋白优选为葡激酶与水蛭素通过连接肽 GSIEGR 连接而成的融合蛋白 SFH (SAK-GSIEGR-HV2)，组织型纤溶酶原激活剂 (t-PA) 与水蛭素通过连接肽 PRIEGR 连接而成的融合蛋白 (tPA-PRIEGR-HV2) 或葡激酶与水蛭素通过连接肽 GSGPR 连接而成的融合蛋白 (SAK-GSGPR-HV2)。

根据本发明，本发明的融合蛋白可在大肠杆菌、毕赤酵母、酿酒酵母或动物细胞中表达，优选在大肠杆菌或酵母中表达。

下面的实施例用来进一步说明本发明，但并不意味着对发明的任何限制。

实施例 1 SAK-GSIEGR-HV2 融合蛋白 (SFH) 的制备及其溶栓和抗凝活性

在 SAK 基因两端分别加上 EcoR I 和 BamH I 酶切位点，构建不带终止密码子的葡激酶 SAK 基因到载体 pBV220，得 pBVS AK；用 PCR 方法在水蛭素基因前加上 BamH I 酶切位点和 FXa 识别氨基酸序列 (GSIEGR) 的编码碱基，BamH I 酶切位点和 FXa 识别氨基酸序列 (GSIEGR) 的编码碱基的加入方法采用引物合成方法合成到水蛭素基因上游 5'端之前，合成的引物为 5'-CG GGA TCC

ATC GAA GGT CGT ATT ACT TAC ACT GAT TGT ACA GAA TCG-3', 水蛭素下游引物合成带有 Pst I 酶切位点; 用 BamH I 和 Pst I 双酶切带 FXa 识别序列的水蛭素基因, 同时 BamH I 和 Pst I 双酶切上述 pBVSAK 载体, 将酶切回收水蛭素基因片段连接到 pBVSAK 载体, 得 pBVSFH 质粒, 连接示意图 1。也可以是拼接重叠 PCR 方法连接上述两个基因片段。将 pBVSFH 质粒转化到大肠杆菌, 42℃ 温度诱导表达。经离子交换、凝胶过滤得到纯度为 96% 以上的目的融合蛋白 (SFH), 融合蛋白含 SAK 氨基酸序列、FXa 识别序列 GSIEGR、水蛭素氨基酸序列三个功能区。融合蛋白 (SFH) 的氨基酸序列为

```

1   sssfdkgkyk kgddasyfep tgpymvnvt gvdgkgnell sphyvefpik
61  pgttlteki eyyvewalda taykefrve ldpsakievt yydknkkkee
101 sfpitekg fvvpdlsehi knpgfnlitr viiekkgsie gritytdcte sgqdlclceg
161 snvcgkgnkc ilgsngeenq cvtgegtpkp qshndgdfee ipeeylq

```

纯化的融合蛋白以发色底物 (S-2251) 法测定融合蛋白的溶栓活性, 通过卡拉胶诱导的小鼠尾部栓塞模型, 融合蛋白 SFH 较 SAK 具有显著的抗凝活性。具体讲, 卡拉胶诱导 24 小时, 每 8 小时腹部给药 SAK 为 1.2mg/kg, 尾部血栓抑制率为 36.6%, 等摩尔数给药融合蛋白 SFH 为 1.8mg/kg, 尾部血栓抑制率为 100%。诱导 36 小时后, 上述同样给药剂量和方式, SAK 和 SFH 对尾部血栓的抑制率分别为 18.2% 和 90%。进一步具体结果见表 1 至表 3。

表 1 发色底物 (S-2251) 法测定融合蛋白 (SFH) 和游离葡激酶 (SAK) 的溶栓活性 ($n=3, \Delta OD_{405}$)

反应时间	SAK	SFH
5min	0.357 \pm 0.22	0.394 \pm 0.01

注: 融合蛋白和游离葡激酶均为 2nM。

表 2 FXa 活化融合蛋白 (SFH) 的抗凝活性

无 FXa 因子作用	0
0.2U 的 FXa 活化 10 分钟	2560ATU

注: 5.8 μ g 融合蛋白 SFH, 0.2U 的 FXa, 37℃ 作用 10min, 活性测定采用凝块法。

表 3 融合蛋白 (SFH) 和游离葡激酶 (SAK) 在体内的抗凝活性 (n = 10)

卡拉胶诱导时间	每组动物数 (只)	SAK	SFH
24 小时	10	36.6%	100%
36 小时	10	18.2%	90%

注: 每 8 小时腹部给药 SAK 为 1.2mg/kg, 等摩尔数给药融合蛋白 SFH 为 1.8mg/kg, 实验动物为昆明小鼠(抗凝活性以药物对卡拉胶诱导的小鼠尾部栓塞的抑制率表示)。

表 1 表明融合蛋白(SFH)与游离的葡激酶 (SAK) 具有等同的溶栓活性; 表 2 表明 采用凝块法测定抗凝活性, 完整的融合蛋白(SFH) 没有抗凝活性, 而在凝血因子 FXa 作用下, 通过释放出水蛭素而表现出全部的抗凝活性 (表 2); 表 3 证明融合蛋白 SFH 具有显著的抗凝活性。因此, 本发明的融合蛋白具有确切的抗凝和溶栓的双功能活性。

实施例 2 tPA-PRIEGR-HV2 融合蛋白的制备

在 tPA 基因上下游分别加上 Xho I 和 Avr II 酶切位点, 构建不带终止密码子的 tPA 基因到 pPIC9 载体; 用 PCR 方法在水蛭素基因上游加上 Avr II 酶切位点和 FXa 识别氨基酸序列的编码碱基, Avr II 酶切位点和 FXa 识别氨基酸序列的编码碱基的加入方法采用引物合成方法合成到水蛭素基因上游 5'端之前, 水蛭素下游引物合成带有 Not I 酶切位点; 用 Avr II 和 Not I 双酶切带 FXa 识别序列的

水蛭素基因并连接到上述构建的带 tPA 基因的 pPIC9 载体的 tPA 下游, 构成融合基因 PAFH, 得质粒 pPAFH。用 BamH I 和 Sal I 双酶切 pPAFH 和 pPIC9K 质粒, 将 PAFH 基因构建到 pPIC9K, 得 pPAFH-K 基因。线性化 pPAFH-K 质粒, 电转化并重组到酵母基因组, 甲醇诱导表达。融合目的蛋白含 tPA 氨基酸序列、FXa 识别序列、水蛭素氨基酸序列三个功能区。

实施例 3 SAK-GSLGPR-HV2 融合蛋白 (STH) 的制备及其溶栓和抗凝活性

在 SAK 基因两端分别加上 EcoR I 和 BamH I 酶切位点, 构建不带终止密码子的葡激酶 SAK 基因到载体 pBV220, 得 pBVSAK; 用 PCR 方法在水蛭素基因前加上 BamH I 酶切位点和凝血酶 (FXIIa) 识别氨基酸序列的编码碱基, BamH I 酶切位点和凝血酶 (FXIIa) 识别氨基酸序列 (GSLGPR) 的编码碱基的加入方法采用引物合成方法合成到水蛭素基因上游 5'端之前, 水蛭素下游引物合成带有 Pst I 酶切位点; 用 BamH I 和 Pst I 双酶切带凝血酶 (FXIIa) 识别序列的水蛭素基因, 同时 BamH I 和 Pst I 双酶切上述 pBVSAK 载体, 将酶切回收水蛭素基因片段连接到 pBVSAK 载体, 得 pBVSTH 质粒, 酶切鉴定。也可以是拼接重叠 PCR 方法连接上述两个基因片段。将 pBVSTH 质粒转化到大肠杆菌, 42℃ 温度诱导表达。经离子交换、凝胶过滤得到纯度为 96% 以上的目的融合蛋白 (STH), 融合蛋白含 SAK 氨基酸序列、凝血酶 (FXIIa) 识别序列、水蛭素氨基酸序列三个功能区。

权 利 要 求

1. 融合蛋白，其含有溶解血栓蛋白，抗凝血蛋白及连接肽。
2. 权利要求 1 的融合蛋白，其中溶解血栓蛋白选自葡激酶(SAK)、组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)、链激酶(SK)、尿激酶(UK)、尿激酶样纤溶酶原激活剂(u-PA)、蛇毒等具有活化其它溶血因子或直接具有溶栓作用的蛋白，或它们的突变体。
3. 权利要求 2 的融合蛋白，其中溶解血栓蛋白为 SAK 或其突变体。
4. 权利要求 1 的融合蛋白，其中抗凝血蛋白选自水蛭素、抗凝血酶 III、蛇毒等，或它们的突变体。
5. 权利要求 4 的融合蛋白，其中抗凝血蛋白为水蛭素或其突变体。
6. 权利要求 1 的融合蛋白，其中连接肽为能被凝血因子识别的氨基酸序列，或含有能被凝血因子识别序列的氨基酸序列。
7. 权利要求 6 的融合蛋白，其中连接肽为能被凝血因子 FXa 识别的氨基酸序列 IEGR 或含有它的肽段。
8. 权利要求 6 的融合蛋白，其中连接肽为能被凝血因子 FIIa(凝血酶)识别的氨基酸序列 GPR(GlyProArg)或含有它的肽段。
9. 权利要求 1 的融合蛋白，其为葡激酶与水蛭素通过连接肽 GSIEGR 连接而成的融合蛋白(SAR-GSIEGR-HV2)，组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)与水蛭素通过连接肽 PRIEGR 连接而成的融合蛋白(tPA-PRIEGR-HV2)或葡激酶与水蛭素通过连接肽 GSGPR 连接而成的融合蛋白(SAK-GSGPR-HV2)。
10. 权利要求 1 的融合蛋白，其为葡激酶与水蛭素通过连接肽 GSIEGR 连接而成的融合蛋白(SAR-GSIEGR-HV2，或 SFH)。

11. 制备含溶解血栓蛋白和抗凝血蛋白的融合蛋白的方法，其包括将溶解血栓蛋白基因与抗凝蛋白基因用含 IEGR 或 GPR 序列对应碱基连接成融合蛋白基因，然后融合蛋白基因在大肠杆菌，酵母或动物细胞体系中表达而得到融合蛋白。
12. 含有融合蛋白及药用载体或赋形剂的药物组合物。
13. 能被凝血因子识别序列的连接肽在制备含有溶解血栓和抗凝血蛋白的融合蛋白中的用途。
14. 能被凝血因子识别并裂解序列的连接肽作为溶解血栓和抗凝血蛋白的连接剂。
15. 治疗与血栓形成有关的疾病与症状的方法，其包括给予血栓患者治疗有效剂量的融合蛋白。

Fig. 1

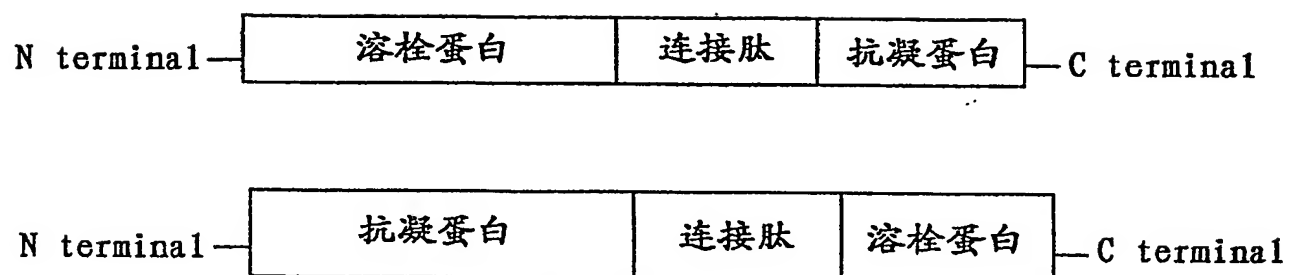
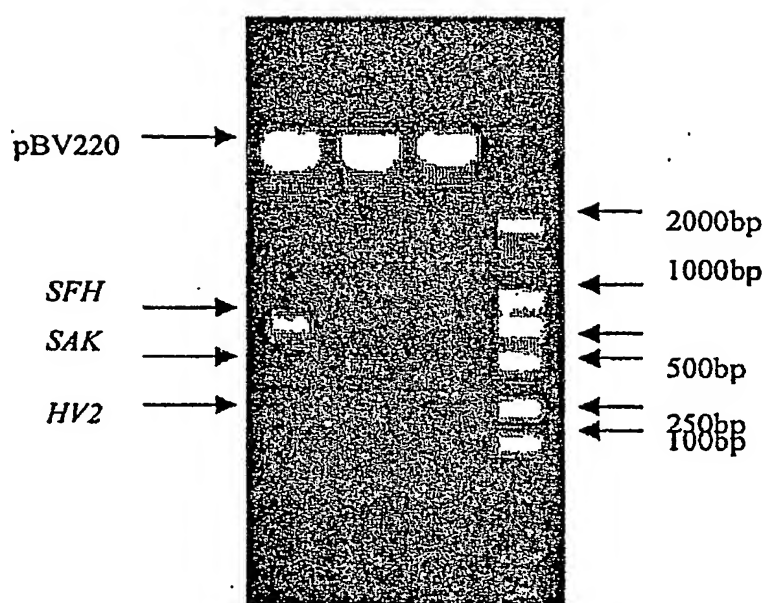


Fig. 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN03/00743

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ C07K19/00 C12N15/62 C12N15/12 A61K38/16 A61P7/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁷ C07K19/00 C12N15/62 C12N15/12 A61K38/16 A61P7/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT WPI EPODOC NCBI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PA	CN1401662A 12 March 2003, Refer to the Whole document	1-14
PA	CN1398972A 26 Feb 2003, Refer to the Whole document	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 17 Sept 2003(17.09.03)	Date of mailing of the international search report 20 NOV 2003 (20.11.03)
Name and mailing address of the ISA/CN 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, 100088 Beijing, China Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer Guo Xiaoyong Telephone No. 8610-62093435

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN03/00743

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos: 15
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 15 is directed to a method of treatment of the human/animal body.
2. ☐ Claims Nos:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN03/00743

A. 主题的分类

IPC⁷ C07K19/00 C12N15/62 C12N15/12 A61K38/16 A61P7/02

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

IPC⁷ C07K19/00 C12N15/62 C12N15/12 A61K38/16 A61P7/02

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

CNPAT WPI EPODOC NCBI

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
PA	CN1401662A 12.3 月 2003, 参见全文	1-14
PA	CN1398972A 26.2 月 2003, 参见全文	1-14

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☐ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

“A” 明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先的申请或专利

“L” 可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

“X” 特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记载的发明就不能认为是新颖的或不能认为是有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 权利要求记载的发明不具有创造性

“&” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

17.9 月 2003(17.9.03)

国际检索报告邮寄日期

20.11月 2003 20.11.03

国际检索单位名称和邮寄地址

ISA/CN

中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号: 86-10-62019451

受权官员



电话号码: 86-10-62093435

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN03/00743

第I栏 关于某些权利要求不能作为检索主题的意见(接第1页第1项)

按条约17(2)(a)对某些权利要求未作国际检索报告的理由如下:

1. ☒ 权利要求(编号): 15

因为它们涉及到不要求本国际检索单位检索的主题, 即:
其涉及疾病的治疗和诊断方法。

2. ☐ 权利要求(编号):

因为它们涉及到国际申请中不符合规定的要求的部分, 以至于不能进行任何有意义的国际检索,
具体地说:

3. ☐ 权利要求(编号):

因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第II栏 关于缺乏发明单一性时的意见(接第1页第2项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了所要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告针对全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求都进行检索, 本国际检索单位未通知缴纳任何附加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分所要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说, 是权利要求(编号):

4. ☐ 申请人未按时缴纳所要求的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求中首先提到的发明;
包含该发明的权利要求是(编号):

关于异议的说明: ☐ 申请人的异议书随附加检索费同时提交。

☐ 支付附加检索费时未提交异议书。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.